重组红火蚁毒素致敏原 Sol i1 的表达及活性分析

韩雪清[1]，林祥梅[1]，张永国[2]，陈 岩[1]，冶贵生[3]，杨伟东[4]，夏巧钰[1]，杨泽晓[3]，王建峰[1]

(1. 中国检验检疫科学研究院，北京 100029；2. 军事医学科学院微生物与流行病学研究所，北京 100071；3. 西北农林科技大学动物科技学院，陕西杨凌 712100；4. 深圳出入境检验检疫局，广东深圳 518045)

摘要：【目的】为研究红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren 毒素蛋白致病分子机理，制备用于红火蚁蜇伤防治的制剂。【方法】本研究采用反转录 PCR(RT-PCR)与套式 PCR(nPCR)扩增出红火蚁体内毒素蛋白 Sol i1 全基因及其活性基因片段 Sol i1a，进行测序与序列分析，构建重组质粒 Sol i1-pET43.1a 和 Sol i1a-pET43.1a，经 PCR、酶切和测序鉴定后转化 BL21(DE3)进行 IPTG 诱导表达，对表达产物进行 SDS-PAGE 分析和 Western blot 检测后，用亲合层析法纯化，并将纯化的重组蛋白通过动物试验进行了致敏活性分析以及过敏体质治疗研究。【结果】本研究克隆的 Sol i1 基因序列与 GenBank 中红火蚁序列同源性为 99%，原核表达预期大小的 2 种重组蛋白能与组氨酸单抗发生特异性反应，且具有较高的致敏活性和良好的免疫治疗效果。【结论】原核表达的 2 种重组蛋白 Sol i1 和 Sol i1a 具有良好的生物活性，为红火蚁蜇伤的致病机理和防治研究奠定了基础。

关键词：红火蚁；基因；致敏原蛋白；表达；生物活性分析

中图分类号：Q966 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2007)07-0655-07

Expression and activity analysis of the recombinant *Solenopsis invicta* Buren venom allergen Sol i1

HAN Xue-Qing[1], LIN Xiang-Mei[1], ZHANG Yong-Guo[2], CHEN Yan[1], YE Gui-Sheng[3], YANG Wei-Dong[4], XIA Qiao-Yu[1], YANG Ze-Xiao[3], WANG Jian-Feng[1] (1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China; 2. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine Sciences, Beijing 100071, China; 3. Animal Science and Technology College, Northwest Sci-Tech Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 4. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Qurantine Bureau, Shenzhen, Guangdong 518045, China)

Abstract:【Objective】To study the molecular pathogenic mechanism of *Solenopsis invicta* Buren venom allergens and produce reagents for the prophylaxis and therapy of *S. invicta* sting.【Methods】In the study, the *S. invicta* venom allergens sol i1 gene and its fragment sol i1a encoding the truncated peptide without transmembrane region were amplified by RT-PCR and nPCR, and then be sequenced. Two recombinant plasmids Sol i1-pET43.1a and Sol i1a-pET43.1a were constructed and verified by PCR, RE digestion and sequencing, and then transformed into *E. coli* BL21(DE3) and induced by IPTG. The expression products were purified by affinity chromatograph following with the identification of SDS-PAGE and Western blotting, and then used to inoculate rabbits for analyzing the allergenic activity and the potential in therapy.【Results】The results showed that the nucleotide homology of the amplified product with that published in GenBank was 99%, and the recombinant fusion proteins expressed in BL21(DE3) at high-level had good allergenic activity and immunotherapy potential.【Conclusions】Recombinant Sol i1 (rSol i1) and recombinant Sol i1a (rSol i1a) expressed in BL21(DE3) both had excellent biological activity, which set basis for further studying the mechanism of *S. invicta* venom allergens and the prevention of *S. invicta*.

Key words: *Solenopsis invicta*; gene; venom allergens; expression; biological activity analysis

---

基金项目：国家质检总局重点科研项目(2005IK169)

作者简介：韩雪清，女，1962 年生，甘肃兰州人，博士，研究员，主要从事病原微生物分子生物学、免疫学及蛋白质功能的研究，E-mail：hanxueq@yahoo.com.cn

收稿日期 Received：2007-02-15；接受日期 Accepted：2007-04-09

红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren 是在我国新发现的一种具有严重危害的外来生物。红火蚁原产于南美洲的巴西、阿根廷、巴拉圭和巴拿马运河一带，其繁殖迅速，具有强大的入侵性和极强的攻击性(Lofgren *et al*., 1975)，它用厉害的螫刺，能迅速攻击任何骚扰其巢穴的人或动物，人被叮咬后，皮肤出现红斑、红肿、痛痒、高烧、休克，一些体质极敏感的人，严重时可导致死亡 (James *et al*., 1976)。由于其能造成重大经济、社会和环境影响，已经被国际上列为最具入侵性和破坏性的百种外来有害生物之一(Deshazo *et al*., 1984；Stafford，1996)。2004 年 9 月我国的广东省吴川市，2005 年广东省珠海市、惠州市、深圳市、湛江、张家界以及香港部分地区相继发生红火蚁疫情，并造成了人员伤害和巨大的经济损失及社会的恐慌 (张润志等，2005；薛大勇等，2005；罗礼智，2005)。

研究发现，红火蚁毒液中过敏原引起的过敏反应是红火蚁蜇伤导致严重反应甚至死亡的主要原因。红火蚁的毒液主要由水、不溶性的生物碱和痕量的蛋白质组成(Baer *et al*., 1979；Hoffman，1987)；毒液中毒素蛋白是已知致敏原中最有效的一类，只需毫微克就可以致敏并诱发过敏反应(Hoffman，1993；Solley *et al*., 2002)，临床上，已被广泛用于红火蚁引起的过敏反应的诊断和红火蚁过敏病人的免疫治疗。Hoffman 等(1988a)从商品化的红火蚁毒液中分离纯化出 Sol i1、Sol i2、Sol i3 和 Sol i4 四种毒素蛋白，其中的主要蛋白是 Sol i2 和 Sol i3，只有少量的 Sol i1 和 Sol i4，用火蚁毒素过敏病人的血清对其进行试验，所有 4 种蛋白均具有明显的致敏活性，并且红火蚁毒液中这 4 种致敏原的 IgE 反应彼此无相关性(Hoffman，1987；Hoffman *et al*.，1988b)。虽然红火蚁毒液中的 4 种毒素蛋白的 IgE 反应间无相关性，但与蜜蜂、黄蜂及斑纹蝎等的毒液过敏原存在交叉反应(Hoffman *et al*.，1988b；Nugent *et al*., 2004)。目前用于红火蚁过敏病人检测和治疗的毒素蛋白主要是通过收集和饲养红火蚁得到的全蚁提取物或纯的毒液，由于毒液中毒素蛋白含量非常低，不易大量制备获得，而且饲养大量的红火蚁也存在一定的风险，这就使得该过程比较复杂和不安全；并且建立在全蚁提取物和纯红火蚁毒液基础上的检测方法不能准确区分红火蚁与蜜蜂、黄蜂及斑纹蝎等的毒液引起的过敏反应。Schmidt 等(1993)首次对 Sol i2 毒素蛋白进行序列测定并克隆分析其编码 cDNA 序列，随后在 Sf9 细胞中进行了表达，表达的重组蛋白 Sol i2(recombinant Sol i2，rSol i2)具有毒蛋白 Sol i2 的构象(Schmidt *et al*.，1996)；利用杆状病毒载体表达的 Sol i3 重组蛋白与毒蛋白有相似的 IgE 活性(Schmidt *et al*., 2003)；对毒蛋白 Sol i1 和 Sol i4 的研究相对较少。红火蚁作为在我国第一次出现的新有害物种，国内对其研究报道甚少。我们从中国新发现红火蚁体内提取 RNA，经过 RT-PCR 与套式 PCR(nPCR)方法获得其毒素蛋白 Sol i1 全基因及其活性基因片段 Sol i1a，经测序后进行了大量表达，并将表达的重组蛋白纯化后，通过动物致敏试验和免疫治疗试验进一步研究了其生物活性，为临床上早期预防、有效诊断和治疗红火蚁蜇伤引起的过敏反应提供了相关制剂。

1 材料与方法

1.1 材料

试剂：Ex Taq 酶、AMV 酶、RNAase 抑制剂、*Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ、质粒纯化试剂盒(Plasmid Mini Kit D6942-01)、凝胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit D2501-01)、DNA Ligation Kit (Promega)等购自宝生物工程(大连)有限公司，QIAamp[R] Viral RNA Mini Kit (52904) 购自 QIAGEN 公司，Ni Sepharose High Performance 购自 Amersham Biosciences 公司。

仪器：Eppendorf Mastercycler PCR 仪，Eppendorf AG Germany 产品；紫外成像系统(ALPHA-5500)；高速冷冻离心机(SORVALL[R])，Heraeus 产品；核酸电泳系统 DYY-8C，北京市六一仪器厂生产，Mini ProTEAN[R]3 System Bio-Rad 产品等。

菌株和载体：pET43.1a 载体购自 Invitrogen 公司，BL21(DE3)、DH5α 由本实验室保存。

红火蚁：由深圳出入境检验检疫局提供。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成：参照 GenBank 已发表的红火蚁核苷酸序列设计 4 条引物(表 1)，引物由宝生物(大连)工程有限公司合成。

表 1 引物编号、序列及长度

Table 1 The code sequence and length of the primers

引物编号 Primer no.	引物序列 Primer sequences	长度 (bp) Length
ES1-f	5′-TCC GAATTCATGAGAAAGTTTGCCGCG-3′	27
ES1-r	5′-GTG CTCGAGTTTATTGCTGCCTGCACTT-3′	28
ES1a-f	5′-CCG GAATTCGGCTTCACCAGTTCTGCA-3′	27
ES1a-r	5′-GTG CTCGAGCTACCCGCACTTATTGCT-3′	27

1.2.2 Sol i1 基因的获取：(1) RNA 的提取：红火蚁的预处理，将一定数量的成年红火蚁工蚁全蚁在

液氮中充分研磨，然后用 PBS 悬浮，800 ×g 离心 5 min，收集上清液，按照 QIAampR Viral RNA Mini Kit（52904）试剂盒操作说明书提取红火蚁的总 RNA，－70℃保存备用。

（2）Sol i1 全基因 RT-PCR：以制备好的总 RNA 为模板进行反转录，总 RNA 10.5 μL，加反向引物 ES1-r 1 μL，65℃水浴 10 min，立即冰浴 5 min，加 5×RT-buffer 4 μL，dNTP 2 μL，AMV 2 μL，RNasin 0.5 μL，42℃ 1 h，反转录产物 －20℃保存，备用；以反转录产物作为 PCR 模板进行扩增：采用 50 μL 反应体系（10×PCR buffer 5 μL，Mg^{2+} 3 μL，dNTP 4 μL，引物 ES1-f 1 μL，引物 ES1-r 1 μL，模板 10 μL，Taq 酶 0.5 μL，ddH_2O 25.5 μL），反应条件为 95℃，5 min；95℃，1 min；50℃，1 min；72℃，1.5 min，35 个循环；72℃，10 min，反应结束后，进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，4℃保存备用。

（3）Sol i1a 基因 nPCR：以（2）中 RT-PCR 的产物为模板进行 Sol i1 活性基因片段 Sol i1a 的扩增，以 ES1a-f 和 ES1a-r 为引物，反应体系与（2）相同，反应条件 95℃，5 min；95℃，60 s；55℃，30 s；72℃，1.5 min，35 个循环；72℃，10 min，反应结束后，进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，4℃保存备用。

（4）测序分析：根据 Gel Extraction Kit 说明书进行 RT-PCR 产物凝胶回收，按照 DNA Ligation Kit（Promega）操作说明将纯化回收产物连于 pGEM-T 载体（pGEM-T 载体 1 μL，T4 DNA Ligase buffer 5 μL，T4 DNA Ligase 1 μL，纯化回收产物 3 μL，混匀后 16℃过夜），按常规方法转化 DH5α 感受态，挑取阳性克隆送宝生物（大连）工程有限公司测序。

1.2.3　重组质粒的构建：（1）表达载体的构建：根据 Gel Extraction Kit 说明书将 RT-PCR 的产物与 nPCR 产物琼脂糖凝胶电泳纯化回收后进行 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切（*Eco*R Ⅰ 5 μL，*Xho* Ⅰ 5 μL，10×H buffer 7 μL，回收 PCR 产物 50 μL，ddH_2O 3 μL，混匀后置 37℃ 反应 3 h）；同时用 Plasmid Mini Kit（D6942-01）提取质粒 pET43.1a，并进行 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切（*Eco*R Ⅰ 5 μL，*Xho* Ⅰ 5 μL，10×H buffer 7 μL，pET43.1a 45 μL，ddH_2O 8 μL，混匀后置 37℃反应 3 h）；酶切反应后用 Gel Extraction Kit 纯化回收酶切产物，4℃存放或 －20℃保存备用。

分别取纯化回收的目的基因酶切产物与表达载体 pET43.1a 酶切产物进行连接。连接体系（10 μL）：目的基因酶切产物 6 μL，pET43.1a 酶切产物 2 μL，10×T4 DNA Ligase buffer 1 μL，T4 DNA Ligase 1 μL；16℃ 连接过夜。

（2）重组质粒的鉴定：按常规方法分别取两种连接产物 3 μL 转化 BL21（DE3）感受态细胞，挑选 Amp^+ 抗性克隆培养扩增，用 Plasmid Mini Kit（D6942-01）提取质粒，进行 PCR、*Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切以及测序鉴定，同时保存菌种。

1.2.4　原核表达：（1）诱导表达：将保存菌种涂布于 Amp^+ LB 板上过夜培养，挑取单个菌落接种于 3 mL 含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 2×YT 培养基中过夜培养后，取 500 μL 接种于 50 mL 2×YT 培养基中于 37℃ 培养 1.5～2.0 h，当 OD_{600} 为 0.6～1.0，加 IPTG 至终浓度为 1.5 mmol/L 进行诱导表达，继续培养 3～4 h 后收菌，进行 SDS-PAGE 分析，同时培养诱导含空载体 pET43.1a 的受体菌。

（2）表达蛋白的检测：根据张维铭（2003）方法进行试剂配置与样品处理。收集诱导表达菌液，3 000×g 离心 5 min，弃上清液，用 PBS 液悬浮后加入等体积的 2×SDS-PAGE 上样缓冲液于沸水中煮 10 min 作为上样样品，分别进行 SDS-PAGE 分析与 Western blotting 检测。

1.2.5　表达蛋白的纯化：（1）Sol i1a 表达蛋白的纯化：将收集的菌体悬浮于 1/10 体积 20 mmol/L Tris（pH 7.0），超声波破碎，使超声时间累积 40 min（工作时间 2 s；间隙时间 2 s；工作次数 90 次；循环次数 6 次；功率 300 Hz）后 12 000×g 4℃离心 30 min，收集上清液，再次离心收集上清液，过滤，作为样品。用 5 倍体积的超纯水洗涤柱子，用 5～10 倍柱子体积的 PBS 平衡。加预处理的样品，重复 3 次上样。用洗涤缓冲液（20 mmol/L Tris，0.5 mol/L NaCl，15 mmol/L 咪唑，pH 7.0）洗涤，考马斯亮蓝检测是否洗涤完全，直到无杂蛋白为止。用洗脱缓冲液（20 mmol/L Tris，0.5 mol/L NaCl，100 mmol/L 咪唑，pH 7.0）溶解洗脱。考马斯亮蓝检测是否洗脱完全。洗脱产物浓缩至体积为 0.5～1.0 mL，将浓缩液移至无菌离心管中，4℃保存。

（2）Sol i1 表达蛋白的纯化：根据 Sambrook（2002）方法采用尿素提取包涵体法进行 Sol i1 表达蛋白的洗涤与溶解，再按照可溶蛋白的纯化方法用 Ni Sepharose High Performance 柱纯化。并将纯化产物进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6　表达蛋白的活性试验：（1）致敏试验：将纯化的蛋白除去咪唑与尿素后用生理盐水稀释至适当浓度（25 μg/mL），分别皮下注射小白鼠和白兔，进行蛋白质活性即过敏性试验。（a）兔体致敏试验：实验兔子为大耳白 15 只，4～6 个月龄，1.5 kg 左右，随机分为 5 组，每组 3 只。首先测定体温、被毛、消毒

后在一侧背部皮下注射纯化蛋白(25 μg/mL),每只兔子注射 0.2 mL。第 1 组,注射 Sol i1 蛋白;第 2 组,注射 Sol i1a 蛋白;第 3 组,注射 Sol i1 蛋白与 Sol i1a 蛋白混合物;第 4 组,注射纯 NUS 蛋白;第 5 组,注射纯生理盐水(空白对照)。注射完毕,每 8 h 观察一次动物反应,连续观察 5 天。(b) 小白鼠致敏试验:取 15 只小白鼠,每组 3 只,分为 5 组,将纯化蛋白稀释至适当浓度,分别分点皮下注射(四肢腋下、腹部)Sol i1 蛋白、Sol i1a 蛋白、Sol i1 蛋白与 Sol i1a 蛋白混合物、纯 NUS 蛋白与生理盐水,每只 0.3 mL,每 8 h 观察一次动物反应,观察 5 天。

(2)蛋白皮试与免疫治疗试验:将纯化的蛋白用生理盐水稀释至适当浓度(蛋白含量 2.0 ng/mL)后,进行皮下注射,每只兔子注射 0.2 mL。取大耳白 15 只,4~6 个月龄,1.5 kg,分为 3 组,每组 5 只。第 1 组,接种 Sol i1 蛋白;第 2 组,接种 Sol i1a 蛋白;第 3 组,注射纯生理盐水(空白对照);8 h 后观察有否过敏反应。

取有过敏反应的兔子进行免疫治疗试验,按表 2 方案分别皮下注射纯化的重组致敏毒素蛋白 Sol i1 和 Sol i1a,在 4 天治疗结束后,再按 1.2.6 节(1)方法进行‘攻毒’实验,观察兔体是否有过敏反应。

表 2 重组致敏毒素蛋白的免疫治疗方案

Table 2 The immunotherapy scheme with the recombinant proteins

免疫时间 Time	皮下接种剂量 Injection dose of the recombinant proteins (μg)			
	第 1 天 Day 1	第 2 天 Day 2	第 3 天 Day 3	第 4 天 Day 4
08:30	0.0003	0.03	65.0	65.0
09:00	0.0006	0.06	65.0	
09:30	0.0012	0.12	65.0	
10:00	0.0024	0.24	65.0	
10:30	0.003	0.3	65.0	
11:00	0.006	0.6	65.0	
11:30	0.012	1.2	65.0	
12:00	0.024	2.4	65.0	
12:30	0.030	3.0	65.0	

2 结果与分析

2.1 Sol i1 基因与 Sol i1a 基因的获取

以红火蚁全蚁提取的总 RNA 为模板,用所设计的 2 对特异性引物进行反转录 PCR(RT-PCR)与套

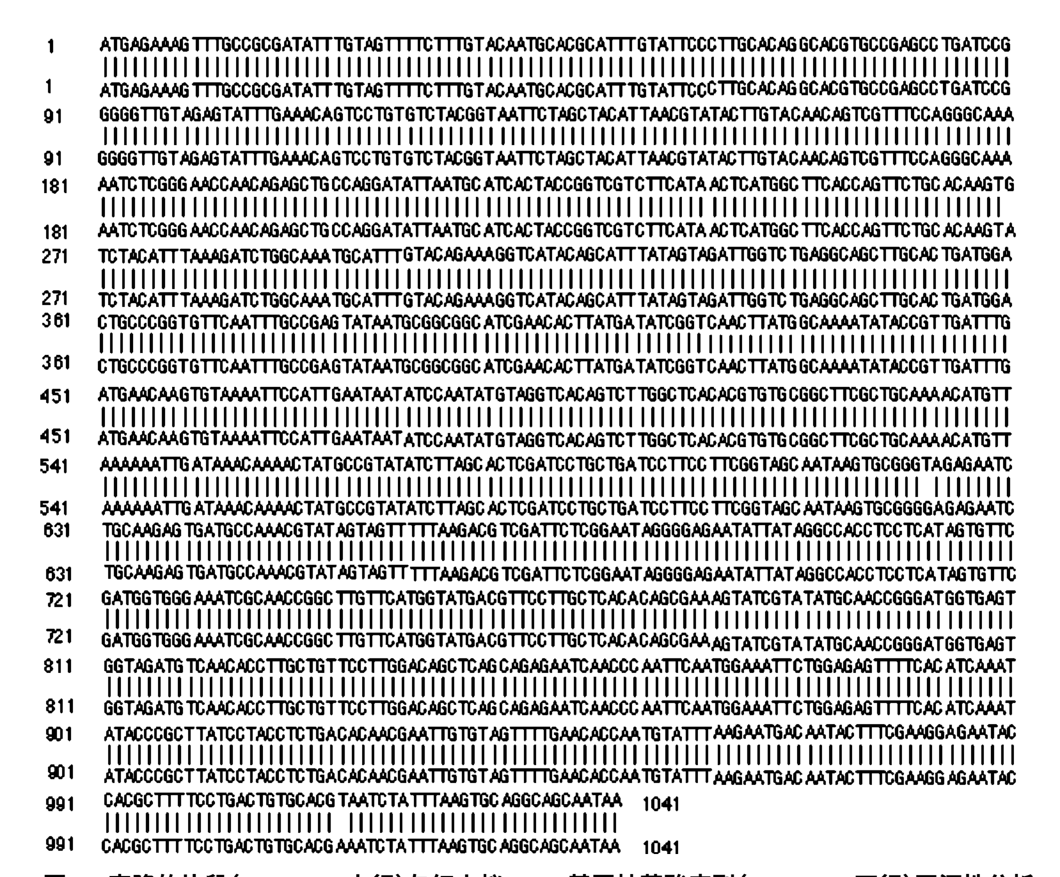


图 1 克隆的片段(DQ016038,上行)与红火蚁 Sol i1 基因核苷酸序列(AY684998,下行)同源性分析

Fig. 1 Alignment of the PCR products (DQ016038, top line) with Sol i1 sequence published (AY684998, bottom line)

“|”表示上下两序列碱基相同“|”indicates identical base in both sequences.

式 PCR(nPCR)分别得到约 1 041 bp 与 372 bp 的特异性条带，然后按 1.2.2 节(4)方法进行扩增产物测序分析(图 1,上行)，扩增的 Sol i1 基因片段为 1 041 bp (GenBank 登录号 DQ016038)，Sol i1a 基因片段为 372 bp。由于 Sol i1a 为 Sol i1 基因的活性片段，我们只对 Sol i1 基因的序列与 GenBank 收录的红火蚁 Sol i1 序列(AY684998)进行了同源性比较，它们之间仅有第 270、622 和 1 014 位的 3 个核苷酸不同(图 1)，同源性达 99%。

2.2 Sol i1 基因与 Sol i1a 基因的表达与纯化

按照 1.2.3 节的操作将获得的 Sol i1 基因与 Sol i1a 基因克隆到表达载体 pET43.1a 中，经 PCR 鉴定与酶切鉴定，结果均为阳性的重组质粒进行测序鉴定确保重组质粒的正确构建，并分别命名为 Sol i1-pET43.1a 和 Sol i1a-pET43.1a。然后将重组质粒转化 BL21(DE3)感受态用 IPTG 诱导表达，SDS-PAGE 分析表明，在约 99 kD 和 74 kD 处出现额外条带(图 2)：Sol i1 基因长度为 1 041 bp，Sol i1a 基因长度为 372 bp，分别编码 498 和 126 个氨基酸，理论分子量分别为 38.2 kD 和 13.9 kD，融合载体上的 NUS-Tag (约 60 kD)和 2 个 His-Tag，与预测的表达重组融合蛋白大小相符，表明 2 个外源基因得到了高效表达。接着对表达蛋白进行 Western blotting 检测，结果表明诱导表达的 2 个融合蛋白都可以与组氨酸单抗发生特异性反应(图 3)。由此可见，所构建的红火蚁致敏毒素 Sol i1 基因全长及部分基因片段重组质粒转化 BL21(DE3)菌经诱导后能良好表达所设计的目的蛋白。根据文献用 Ni-NTA 介质金属螯和亲和层析柱对 Sol i1-pET43.1a 和 Sol i1a-pET43.1a 重组蛋白进行了纯化(图 4)，其中 Sol i1a 表达蛋白为可溶性蛋白，Sol i1 表达蛋白为包涵体蛋白，因此 Sol i1 表达蛋白纯化洗脱缓冲液中含有 8 mol/L 的尿素进行生物活性实验前需透析除去。

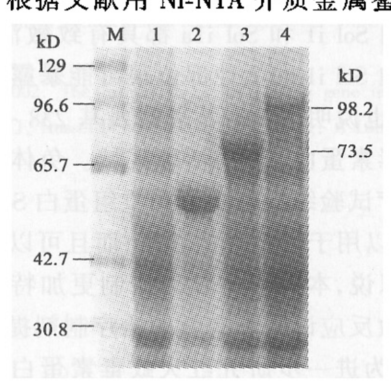


图 2 表达蛋白的 SDS-PAGE 检测结果

Fig. 2 SDS-PAGE detection of protein expressed in *E. coli*

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：BL21(DE3)培养物 BL21(DE3) culture；2：pET43.1a 转化 BL21(DE3)培养物 pET43.1a transformed BL21(DE3) culture；3：Sol i1a-pET43.1a 转化 BL21(DE3) 培养物 Recombinant plasmid Sol i1a-pET43.1a transformed BL21(DE3) culture；4：Sol i1-pET43.1a 转化 BL21(DE3) 培养物 Recombinant plasmid Sol i1-pET43.1a transformed BL21(DE3) culture.

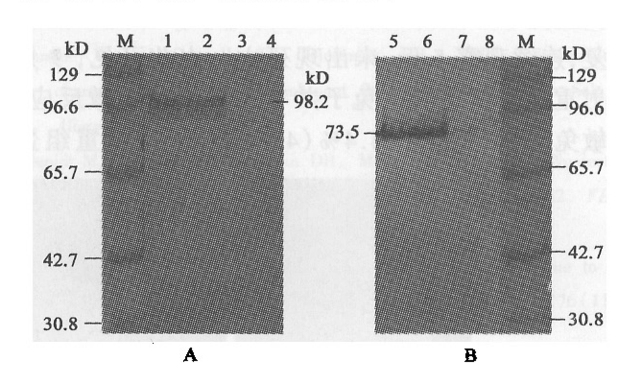


图 3 重组蛋白的 Western blotting 检测结果

Fig. 3 Western blotting of the recombinant proteins

A：Sol i1-pET43.1a 表达蛋白的 Western blotting 检测结果 The Western blotting results of Sol i1-pET43.1a protein expressed in *E. coli*；B：Sol i1a-pET43.1a 表达蛋白的 Western blotting 检测结果 The Western blotting results of Sol i1a-pET43.1a protein expressed in *E. coli*. M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1，2：Sol i1-pET43.1a 重组质粒转化 BL21(DE3) Sol i1-pET43.1a transformed BL21(DE3)；5，6：Sol i1a-pET43.1a 重组质粒转化 BL21(DE3) Sol i1a-pET43.1a transformed BL21(DE3)；3，4，7，8：pET43.1a 转化 BL21(DE3) pET43.1a transformed BL21(DE3).

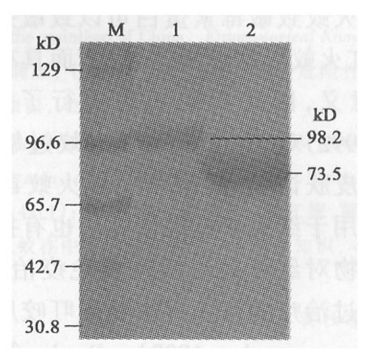


图 4 目的蛋白的纯化结果

Fig. 4 Purification results of the recombinant proteins

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：Sol i1 纯化蛋白 Purification of Sol i1 recombinant protein；2：Sol i1a 纯化蛋白 Purification of Sol i1a recombinant protein.

2.3 蛋白活性试验结果

由于表达的重组蛋白融合有 NUS-Tag，因此本试验设计了生理盐水空白对照组和 NUS 蛋白对照组。结果表明：小白鼠注射重组蛋白后没有异常反应；而大耳白注射重组蛋白后反应明显，出现发热、精神沉郁现象。注射 15 h 后，第 1 组 1 只白兔开始出现呼吸急促，体温升高至 41.2℃，全身出现紫斑，耳部尤为严重(图 5：A)，其他组正常；注射 24 h 后，

第2组1只白兔出现耳部紫癜,肿胀严重,体温40.5℃(图5: B);第3组有2只白兔出现精神沉郁,体温升高至40.9℃,皮肤出现红肿(图5: C);第4、5组纯NUS蛋白与生理盐水对照组的白兔体温正常,为39.0℃~39.3℃,皮肤正常(图5: D);72 h后,过敏反应兔子开始好转;96 h后,过敏反应兔子完全康复,连续观察5天,未出现死亡。由此可见,9只注射重组蛋白的实验兔子共有4只出现过敏反应,过敏兔子比率达到44.4%(4/9);兔子接种重组蛋白后最早在8 h左右开始发热,16~24 h后体温达到最高,最高可达41.2℃,72 h后基本恢复正常体温;这说明两种重组蛋白均有较强的致敏活性。

按照1.2.5节(1)方法进行重组蛋白的蛋白皮试与免疫治疗试验,第1组与第2组分别出现2只和3只过敏反应的兔子,取过敏体质的兔子进行免疫治疗4天后,再次接种纯化的致敏毒素蛋白后均未出现明显的过敏反应,表明这两种重组蛋白对过敏体质的兔子具有相应的免疫治疗效果。

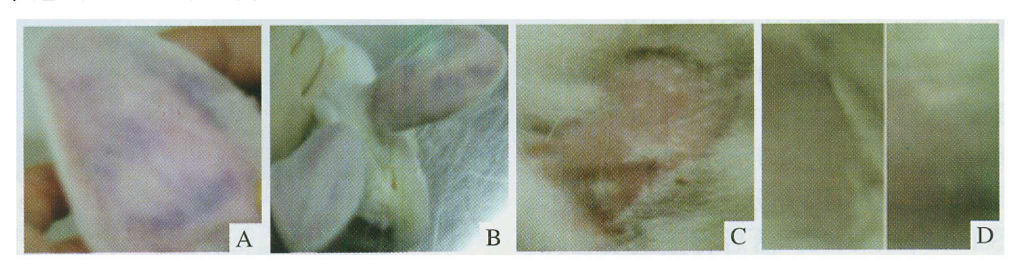


图5 注射重组蛋白后兔体反应

Fig. 5 Rabbit response to the recombinant proteins

A: 兔子对重组蛋白Sol i1的病理反应 Pathogenic response to recombinant Sol i1 (rSol i1);
B: 兔子对重组蛋白Sol i1a的病理反应 Pathogenic response to rSol i1a;
C: 兔子对重组蛋白Sol i1a与Sol i1的病理反应 Pathogenic response to rSol i1 and rSol i1a;
D: NUS蛋白和生理盐水对照组兔子的反应 Control group.

3 讨论

虽然红火蚁致敏毒素蛋白可以致敏并诱发过敏反应,但在红火蚁过敏诊断、治疗方面具有重要的实用价值和意义,因此人们对之进行了大量研究。Stafford等(1992)对33个成年红火蚁过敏病人进行红火蚁毒液皮肤试验,结果表明红火蚁毒液可以安全和有效的用于红火蚁过敏诊断。也有报道用红火蚁全蚁提取物对红火蚁过敏进行免疫治疗的试验,结果表明经过治疗的病人再次受到叮咬后只有局部的反应(Freeman *et al*., 1992)。Ponder等(1994)还利用红火蚁毒液致敏蛋白建立了检测火蚁毒液特异IgE的ELISA方法,与毒液放射变应原吸附测定法(Radio allergosorbent test, RAST)相比,成本较低并且更加敏感,而国内尚无相关研究报道。我们对红火蚁体内毒素蛋白Sol i1全基因进行了序列分析与表达,并研究了其表达产物的生物活性,填补了我国在这方面研究的空白。

本研究用RT-PCR获取的毒素蛋白Sol i1全基因测序鉴定后进行同源性比较,与AY684998核苷酸同源性高达99%(图1),氨基酸序列同源性为99%(AAT95008);用OMIGA2.0对Sol i1、Sol i2、Sol i3和Sol i4氨基酸序列同源性分析,Sol i1与Sol i2、Sol i3与Sol i4同源性都不超过8%,Sol i2与Sol i4氨基酸序列同源性仅为40%,这与Hoffman(1993)报道的Sol i2与Sol i4氨基酸序列同源性为35%相符合,也进一步证明了4种毒素蛋白的IgE反应间无相关性。

本研究中考虑到Sol i1全基因的原核表达产物为包涵体蛋白及包涵体对蛋白活性的影响,同时表达了Sol i1活性基因片段Sol i1a。兔体致敏试验表明重组蛋白Sol i1和Sol i1a都具有致敏活性,这暗示重组蛋白Sol i1的活性部位很可能暴露在包涵体表面,而且也说明Sol i1氨基酸残基238~347区域可能就是毒素蛋白Sol i1活性区域。兔体蛋白皮试和免疫治疗试验结果初步表明重组蛋白Sol i1与Sol i1a不仅可以用于过敏性的诊断,而且可以用于免疫治疗。可以说,本研究不仅为研制更加特异的红火蚁毒液过敏反应诊断和有效的治疗制剂提供了科学依据,而且为进一步研究红火蚁毒素蛋白致病分子机理奠定了基础。

参考文献(References)

Baer H, Liu TY, Anderson MC, Blum M, Schmid WH, James FJ, 1979. Protein components of fire ant venom (*Solenopsis invicta*). *Toxicon*, 17: 397-405.

Deshazo RD, Griffing C, Kwan TH, Banks WA, Dvorak HF, 1984. Dermal hypersensitivity reactions to imported fire ants. *J. Allergy Clin.*

Immunol., 74：841 - 847.

Freeman TM, Hylander R, Ortiz A, Martin ME, 1992. Imported fire ant immunotherapy: effectiveness of whole body extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 90(2)：210 - 215.

Hoffman DR, 1987. Allergens in Hymenoptera venom. XVII. Allergenic components of *Solenopsis invicta* (imported fire ant) venom. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 80(3 Pt 1)：300 - 306.

Hoffman DR, 1993. Allergens in Hymenoptera venom. XXIV. the amino acid sequences of imported fire ant venom allergens Sol i II, Sol i III, and Sol i IV. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 91(1 Pt 1)：71 - 78.

Hoffman DR, Dove DE, Jacobson RS, 1988a. Allergens in Hymenoptera venom. XX. Isolation of four allergens from imported fire ant (*Solenopsis invicta*) venom. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 82(5)：818 - 827.

Hoffman DR, Dove DE, Moffitt JE, Stafford CT, 1988b. Allergens in Hymenoptera venom. XXI. Cross-reactivity and multiple reactivity between fire ant venom and bee and wasp venoms. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 82(5)：828 - 834.

James FKJr, Pence HL, Driggers DP, Jacobs RL, Horton DE, 1976. Imported fire ant hypersensitivity: Studies of human reactions to fire ant venom. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 58(1)：110 - 120.

Lofgren CS, Banks WA, Glancey BM, 1975. Biology and control of imported fire ants. *Annu. Rev. Entomol.*, 20：11 - 30.

Luo LZ, 2005. Considerations and suggestions on managing the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren in China. *Plant Protection*, 31(2)：5 - 8. [罗礼智, 2005. 控制我国红火蚁危害的几点思考. 植物保护, 31(2)：5 - 8]

Nugent JS, More DR, Hagan LL, Demain JG, Whisman BA, Freeman TM, 2004. Cross-reactivity between allergens in the venom of the common striped scorpion and the imported fire ant. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 114(2)：383 - 386.

Ponder RD, Stafford CT, Kiefer CR, Ford JL, Thompson WO, Hoffman DR, 1994. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of fire ant venom-specific IgE. *Ann. Allergy*, 72(4)：329 - 332.

Sambrook J, 2002. The expression of the cloning gene in *E. coli*. In: Sambrook J, Russel D eds. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Beijing: Science Press. 1 252 - 1 260. [J. 萨姆布鲁克, 2002. 在大肠杆菌中表达克隆化基因. 见：J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆试验指南. 第 3 版. 北京：科学出版社. 1 252 - 1 260]

Schmidt M, McConnell TJ, Hoffman DR, 1996. Production of a recombinant imported fire ant venom allergen, Sol i2 in native and immunoreactive form. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 98：82 - 88.

Schmidt M, McConnell TJ, Hoffman DR, 2003. Immunologic characterization of the recombinant fire ant venom allergen Sol i3. *Allergy*, 58：342 - 349.

Schmidt M, Walker RB, Hoffman DR, McConnell TJ, 1993. Nucleotide sequence of cDNA encoding the fire ant venom protein Sol i2. *FEBS Lett.*, 319(1 - 2)：138 - 140.

Solley GO, Vanderwoude C, Knight GK, 2002. Anaphylaxis due to red imported fire ant sting. *The Medical Journal of Australia*, 176(11)：521 - 523.

Stafford CT, 1996. Hypersensitivity to fire ant venom. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 77：87 - 95.

Stafford CT, Wise SL, Robinson DA, Crosby BL, Hoffman DR, 1992. Safety and efficacy of fire ant venom in the diagnosis of fire ant allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 90(4 Pt 1)：653 - 661.

Zhang WM, 2003. Polyacrylamide gel electrophoresis. In: Zhang WM ed. Molecular Biology Laboratory Manual. 1st ed. Beijing: Science Press. 122 - 126, 359 - 361. [张维铭, 2003. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 见：张维铭主编. 现代分子生物学手册. 第 1 版. 北京：科学出版社. 122 - 126, 359 - 361]

Zhang RZ, Ren L, Liu N, 2005. An introduction and strict precautions against red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, for its potential invasion to the mainland of China. *Entomological Knowledge*, 42(1)：6 - 10. [张润志, 任立, 刘宁, 2005. 严防危险性害虫红火蚁入侵. 昆虫知识, 42(1)：6 - 10]

Xue DY, Li HM, Han HX, Zhang RZ, 2005. A prediction of potential distribution area of *Solenopsis invicta* in China. *Entomological Knowledge*, 42(1)：57 - 10. [薛大勇, 李红梅, 韩红香, 张润志, 2005. 红火蚁在中国的分布区预测. 昆虫知识, 42(1)：57 - 10]

（责任编辑：黄玲巧）